

試験報告書

除菌消臭剤の犬パルボウイルスに対する 不活化効果に関する試験

(試験番号：16-019)

試験の表題

除菌消臭剤の犬パルボウイルスに対する不活化効果に関する試験
(試験番号：16-019)

試験委託者

名 称：株式会社 FMI
所 在 地：〒101-0047 東京都千代田区内神田 3-21-8-502
委託責任者：代表取締役 松永 敏宏
委託担当者：代表取締役 松永 敏宏

試験実施施設

名 称：一般財団法人生物科学安全研究所
所 在 地：神奈川県相模原市緑区橋本台 3 丁目 7 番 11 号
代 表 者：理事長 萬田 富治
試験責任者：事業部 主任研究員 中島 隆二

試験期間

平成 28 年 4 月 25 日～平成 28 年 6 月 xx 日

試験責任者の署名

一般財団法人生物科学安全研究所

_____ 印 年 月 日

試験の目的

「奇跡の除菌・消臭剤 I Love Pet」の犬パルボウイルスに対する不活化効果を確認することを目的とした。

試験材料

1) 試験品

名 称：奇跡の除菌・消臭剤 I Love Pet

性 状：液体（有効成分 二酸化塩素）

ロ ッ ト：160322

入手年月日：2016年4月28日

入 手 量：100 mL×1本

2) 対照品

名 称：300 ppm 二酸化塩素製剤

性 状：液体（有効成分 二酸化塩素）

ロ ッ ト：160427

入手年月日：2016年4月28日

入 手 量：100 mL×1本

3) 供試ウイルス

名 称：犬パルボウイルス（CPV）Cp49株

由 来：東京大学大学院生命科学研究科・農学部 獣医微生物学教室から分与を受けた株を試験実施施設において猫腎継代細胞を用いて2代継代培養したもの。

ウイルス含有量： $10^{7.25}$ TCID₅₀/mL

牛胎児血清（FBS）含有量：2%

保 存 条 件：-70℃以下

4) 供試細胞

ウイルスの定量に、以下の細胞を用いる。

名 称：猫腎継代細胞（CRFK細胞）

由 来：大日本住友製薬グループから購入し、試験実施施設において維持しているもの。

試験方法

1) 試験品及び対照品

試験委託者から供給された原液を試験品及び対照品とした。

2) 供試ウイルス液の調製

供試ウイルスを希釈液 [付記 1] で 10 倍希釈し、FBS 濃度が 1%未満になるように調製したものを供試ウイルス液とした。

3) 試験方法

試験品又は対照品と供試ウイルス液を 99 : 1 の割合で混合し（これを「試験試料」という。）、室温に置き、混合直後、1 分及び 3 分後のウイルス含有量を測定した。

対照として、滅菌 MilliQ 水と供試ウイルス液を 99 : 1 で混合し（これを「対照試料」という。）、室温に置き、混合直後、1 分及び 3 分後のウイルス含有量を測定した。

試験の繰り返しは 3 回とした。

4) ウイルス含有量の測定

細胞培養フラスコに単層を形成した CRFK 細胞をトリプシン処理し、細胞増殖用培養液 [付記 2] で細胞濃度を約 2×10^5 個/mL に調製した。この細胞浮遊液を 24 ウェルマルチプレートの各ウェルに 0.5 mL ずつ播きこみ、試料接種までの間、37°C、5%炭酸ガス孵卵器中に静置した。

感作終了後の試験試料および対照試料を細胞増殖用培養液で 10 倍階段希釈し、24 ウェルマルチプレートに分注した CRFK 細胞に 1 ウェル当たり 0.1 mL、1 希釈当たり 4 ウェルに接種した。37°C、5%炭酸ガス孵卵器で一夜培養した後、培養液を吸引除去し、0.5 mL のウイルス増殖用培養液 [付記 3] を加え、37°C、5%炭酸ガス孵卵器で 6 日間培養した。培養最終日に各ウェルから培養上清を 0.025 mL 採取し、96 ウェル V 底プレートに移し、等量の牛血清アルブミン加ホウ酸緩衝食塩液 [付記 7] を加え、さらに、VAD6.0 液 [付記 8] で調製した 0.5 vol% 豚赤血球浮遊液 [付記 9] を 0.05 mL 加えて 4°C で一夜静置し、赤血球凝集 (HA) の有無を観察した。HA が認められた培養液をウイルス陽性とみなし、ベーレンス・ケルバー法にてウイルス含有量を算出した。

5) 評価

以下の方法で Log Reduction Value (LRV) を算出した。

$$\text{LRV} = \log_{10}A - \log_{10}B$$

A : 対照試料のウイルス含有量

B : 試験試料のウイルス含有量

LRV が 2 以上のとき有効と判定した。また、LRV が 1 以下の場合、試験品はウイルス不活化効果がないものと判断した。

6) 濃度測定

上水試験方法 2011 年度版、III-2、13. 4 ヨウ素滴定法により、試験品及び対照品中の二酸化塩素 (ClO_2)、亜塩素酸イオン (ClO_2^-)、塩素酸イオン (ClO_3^-)、残留塩素 (Cl_2) の濃度を測定した。

試験の繰り返しは 3 回とした。

試験成績及び結論

不活化効果試験成績を表 1、濃度測定結果を表 2 に示す。

試験品と犬パルボウイルスを 99 : 1 の割合で混合し、室温で感作した結果、全ての時点において LRV が 2 以上であった。一方、対照品の結果は、全ての時点において LRV が 1 以下であった。

以上の成績から試験品「奇跡の除菌・消臭剤 I Love Pet」は本試験系において、犬パルボウイルスに対する不活化効果を有することが確認され、対照品「300 ppm 二酸化塩素製剤」の犬パルボウイルスに対する不活化効果は認められなかった。

- [付記 1] 希釈液
 1,000 mL 中
 イーグル MEM (TPB 含有) [付記 4] 980 mL
 7%炭酸水素ナトリウム液 20 mL
- [付記 2] 細胞増殖用培養液
 1,000 mL 中
 イーグル MEM (TPB 含有) 880 mL
 牛胎児血清 100 mL
 7%炭酸水素ナトリウム液 20 mL
- [付記 3] ウイルス増殖用培養液
 1,000 mL 中
 イーグル MEM (TPB 含有) 960 mL
 牛胎児血清 20 mL
 7%炭酸水素ナトリウム液 20 mL
- [付記 4] イーグル MEM (TPB 含有)
 1,000 mL 中
 イーグル MEM 「ニッスイ」 ① 9.4 g
 (カナマイシン含有, 日水製薬株式会社 製)
 トリプトースホスフェイトブロス (Difco) 3.0 g
 MilliQ 水 1 L
 溶解後、121°C、15 分間高圧蒸気滅菌し、室温まで冷ました後、以下の試薬を加える。
 L-グルタミン液 [付記 5] 10 mL
 ペニシリン・ストレプトマイシン液 [付記 6] 10 mL
- [付記 5] L-グルタミン液
 L-グルタミンを 200 mM 含む液体
- [付記 6] ペニシリン・ストレプトマイシン液
 1 mL 中に、ペニシリン 10,000 IU、ストレプトマイシン 10,000 µg 力価を含む液体

[付記 7] 牛血清アルブミン加ほう酸緩衝食塩液

1,000mL 中

塩化ナトリウム	7.01 g
ほう酸	3.05 g
水酸化ナトリウム	0.96 g
水	残 量

牛血清アルブミンを 0.2 w/v% となるように加えた後、水酸化ナトリウムで pH を 9.0 に調整する。

[付記 8] VAD 6.0 液

1,000mL 中

塩化ナトリウム	8.77 g
無水りん酸水素二ナトリウム	5.68 g
りん酸二水素ナトリウム二水和物	40.56 g
水	残 量

牛血清アルブミン加ほう酸緩衝食塩液と等量混合したとき、pH 6.0 になるように調整する。

[付記 9] 0.5vol% 豚赤血球浮遊液

健康な豚からアルスパー液中に採血して得た血液を、VAD 6.0 液 [付記 8] で 3 回洗浄した後、VAD 6.0 液で 0.5vol% となるように調製したもの。

表1 犬パルボウイルスに対する不活化効果試験成績

試料の区分		試験の 繰り返し	感作時間とウイルス含有量		
			直後	1分	3分
対照試料	滅菌MilliQ水	1	4.00	3.75	4.00
		2	3.75	3.50	4.00
		3	3.75	4.00	4.25
		平均	3.83	3.75	4.08
試験試料	試験品	1	≦ 1.75	≦ 1.50	≦ 1.50
		2	≦ 1.50	≦ 1.50	≦ 1.50
		3	≦ 1.75	≦ 1.50	≦ 1.50
		平均	≦ 1.67	≦ 1.50	≦ 1.50
	※ ¹ LRV	≧ 2.2	≧ 2.3	≧ 2.6	
	対照品	1	4.50	4.00	4.50
2		4.25	4.00	4.00	
3		4.50	4.00	3.50	
平均		4.42	4.00	4.00	
	※ ¹ LRV	0.0	0.0	0.1	

ウイルス含有量は試料 1 mL中の値（単位：TCID₅₀）を常用対数変換して表示した。

本試験系における検出限界値（≦1.50）

※1：LRV=log₁₀（対照試料のウイルス含有量）－log₁₀（試験試料のウイルス含有量）

表2 各試験試料の濃度測定結果

試験品名	二酸化塩素	亜塩素酸イオン	塩素酸イオン	残留塩素
試験品 奇跡の除菌・消臭剤 I Love Pet	76.75	22.57	264.42	0.00
対照品 300 ppm二酸化塩素製剤	4.51	337.42	204.83	18.98

ヨウ素滴定法により測定した結果をmg/Lで表示した。